

Morfología de los oocitos en diplotene de *Melanophryniscus stelzneri* (Weyenbergh, 1875) (Anura, Bufonidae)

María Fernanda ROCA & Dinorah Diana ECHEVERRÍA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), Departamento de Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Vertebrados, 1428 Buenos Aires, Argentina

Five stages of the oogenesis, with eight substages of the diplotene oocyte development, are identified applying histological and transmission electron microscopy techniques. Based on the internal morphology of the oocytes, the following features were taken into account: yolk vesicles, yolk platelets, cortical granules and pigment appearance, morphological variations of the nuclear envelope and nucleoli.

INTRODUCCIÓN

La distribución geográfica de las especies del género *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 se halla restringida a Sudamérica. CEI (1980) mencionó la existencia de cuatro subespecies de *M. stelzneri*, de las cuales *M. s. stelzneri* habita en las sierras de Córdoba y San Luis

Es frecuente hallar ejemplares de *M. s. stelzneri* activos durante el día, luego de fuertes lluvias, cerca de arroyos o pequeños cuerpos de agua de zonas serranas, entre los 900 y 2.000 m. La época de reproducción de la especie abarca desde mediados de octubre a fines del verano (GALLARDO, 1987).

Debido a lo restringido de su distribución y a que estos animales son comercializados como mascotas, se hallan entre las especies que la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y la FVSA (Fundación Vida Silvestre Argentina) coinciden en llamar *raras* (especies sujetas a riesgo) y *comercialmente amenazadas*, respectivamente. La extracción de estos animales de su medio ambiente, llevada a cabo en forma indiscriminada, podría afectar, por ejemplo, la abundancia y distribución de las poblaciones de *M. s. stelzneri* en los ambientes serranos.

El estudio de la oogénesis en los anuros ha sido objeto de numerosas investigaciones, que en su mayoría han destacado la variación morfológica de los oocitos en el ovario adulto durante el período reproductivo de la especie. La caracterización histológica de los oocitos del ovario se ha efectuado en diversas especies. Se pueden mencionar, por ejemplo, los trabajos de BOUIN (1901) en *Rana sylvatica*, KING (1908) en *Bufo lentiginosus*, ALLENDE (1938), VALDEZ TOLEDO & PISANÓ (1980) y ECHEVERRÍA (1988) en *Bufo arenarum*, KEMP

(1953) en *Rana pipiens*, IWASAWA (1969) en *Rana ornativentris*, DUMONT (1972) en *Xenopus laevis*, LAMOTTE et al. (1973) en *Nectophrynoides occidentalis*, y IWASAWA et al. (1987) en *Rana nigromaculata*.

El proceso más evidente de la maduración de los oocitos es la vitelogenésis. Se han propuesto distintos modelos para explicar la formación del vitelo. Tanto WALLACE (1985) como DUMONT (1972) han expresado que el principal proceso de adquisición de vitelo en los oocitos de *Xenopus laevis* es la micropinocitosis. OPRESKO et al. (1980) propusieron un modelo de compartimentalización endocítica de las proteínas en oocitos de *X. laevis*. En varias especies de anfibios se ha descrito la formación de inclusiones cristalinas dentro de las mitocondrias en oocitos que fueron interpretadas como progenitoras de los cristales formados dentro de las plaquetas (WARD, 1962; KARASAKI, 1963; WALLACE & KARASAKI, 1963; LANZAVECCHIA, 1968; WALLACE & DUMONT, 1968; MASSEVER, 1971; WALLACE et al., 1972). Años después, WARD et al. (1985) concluyeron que las formaciones cristalinas no eran precursoras del vitelo. En oocitos jóvenes se ha observado la presencia de cuerpos multivesiculares (LANZAVECCHIA, 1968) que han sido relacionados con la síntesis endógena de vitelo (WALLACE, 1985). VILLECCO et al. (1992) han observado en *Ceratophrys cranwelli* la formación de cuerpos multivesiculares como precursores de las plaquetas vitelinas, que se originan de la fusión de endosomas.

Es una característica sobresaliente de los oocitos de anfibios la presencia de una gran cantidad de nucléolos en ciertas etapas del crecimiento. Estos nucléolos son formados a partir de genes del ADN ribosomal, que se hallan amplificados en los oocitos de anfibios (BROWN & DAWID, 1968; AMALDI et al., 1973; SCHEER & DABAWALLE, 1985).

En *Rana temporaria* y *Bufo arenarum*, al cabo de tres años los oocitos finalizan su desarrollo y la hembra alcanza la madurez sexual (GRANT, 1953; ECHEVERRÍA, 1988). VALDEZ TOLEDO & PISANÓ (1980) han convenido en clasificar las fases de la ovogénesis de *Bufo arenarum* en cinco estadios. Se pueden distinguir cuatro estadios inmaduros (previtelogenésis, vitelogenésis temprana, vitelogenésis tardía y oocito en auxocitosis) que conducen al estado final postvitelogénico de oocito ovulable (ECHEVERRÍA, 1988).

El propósito de este trabajo radica en caracterizar los estadios de la ovogénesis en *M. s. stelzneri* como primeros pasos hacia el conocimiento de la biología reproductiva de la especie en cuestión que, sumado a otras investigaciones, permitirían implementar una buena y eficiente estrategia de conservación de *M. s. stelzneri*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se capturaron 17 hembras de *Melanophryniscus stelzneri* en las localidades de Tanti, provincia de Córdoba y El Trapiche, provincia de San Luis, en los meses de octubre, diciembre y febrero.

Los animales fueron adormecidos con éter y luego colocados con el abdomen abierto en distintos fijadores.

La muestra constó de trozos de ovario de aproximadamente 5 mm × 5 mm de espesor y de oocitos aislados de cada una de las hembras.

A fin de conocer el aspecto general de los oocitos se realizó el examen con microscopio estereoscópico. Se implementaron dos técnicas complementarias.

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS GENERALES (SEGÚN ECHEVERRÍA, 1988)

- Líquidos fijadores. formol al 10 %; solución de Bouin; líquido de Zenker.
- Inclusión: en parafina 56-58°.
- Técnicas de coloración e histoquímicas (DRURY & WALLINGTON, 1967; PEARSE, 1972): hematoxilina - eosina, tricómico de Masson, coloración de Mann; reacción del ácido peryódico Schiff (PAS) - hematoxilina; PAS - azul Alcian (pH 3,5); PAS - diastasa; verde de metilo-pironina.

TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Fijación con glutaraldehído 3 % en buffer cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2-7,4), refijación con tetróxido de osmio 2 %; coloración en bloque con acetato de uranilo 2 %, deshidratación en alcoholes de graduación ascendente, con líquido intermediario óxido de propileno; impregnación e inclusión en Polybed.

Se realizaron cortes de 500 Å que se recogieron en grillas y se colorearon sucesivamente con solución de Reynolds (acetato de uranilo al 2 %, citrato de plomo) según REYNOLDS (1963, fide MERCER & BIRBECK, 1979), y nitrato de bismuto en solución de tartrato de sodio.

Se han establecido los estadios de desarrollo de los oocitos según ECHEVERRÍA (1988), teniendo en cuenta diferentes características anatómicas e histológicas que se mencionan en la Tabla I.

Los estadios de la oogénesis se identificaron a partir de las observaciones de los oocitos desprovistos de la teca externa y de la serosa, y se dividieron en subestadios para facilitar las observaciones del progreso de la oogénesis.

RESULTADOS

ESTADIO 1. PREVITELOGÉNESIS

Son los oocitos de tamaño más pequeño (subtipo *a*), entre 22 y 50 µm de diámetro. Se ubican por fuera de la teca externa, cubiertos por la serosa que envuelve al ovario. Presentan un citoplasma transparente a través del cual se observa el núcleo ocupando gran parte de la célula. El contenido citoplasmático, de apariencia granular, es levemente basófilo. El núcleo es esférico y central, con la membrana lisa. En la periferia del núcleo se disponen prominentes nucléolos esferoidales y de contorno irregular, en un número que

Tabla I. Caracteres morfológicos y métricos para la identificación de los estadios del desarrollo de los oocitos de *Melanophryniscus stezneri* en cortes histológicos. A, anulares; B, bipartitos; C, central; E, esféricos; G, plegada; L, lisa; O, ondulada; S, saculada; P, polarizado; V, vacuolados; +, presencia; #, escasos y aislados; *, ordenados; -, ausencia.

Estadio	Subtipo	Diámetro mínimo-máximo	Núcleo			Citoplasma			Membrana vitelina
			Posición	Membrana nuclear	Nucléolos	Vitelo	Pigmento	Gránulos corticales	
1	a	22-50	C	L	E	-	-	-	-
	b	50-150	C	L	E	-	-	-	-
	c	150-270	C	O	E	-	-	-	±
2	a	270-310	C	S	B	-	-	-	+
	b	310-350	C	S	B	+	-	-	+
3	a	350-650	C	S	A, B, E	+	+	+ #	+
	b	650-740	C	S	B y E	+	+	+ #	+
	c	750-900	P leve	S	B y V	+	P +	+ #	+
4		900-1200	P	G	E y V	P +	P +	+ *	+
5		1200-1400	P	G	E y V	+	+	+ *	+

varía entre cinco y diez. El nucleoplasma presenta densas granulaciones intensamente coloreadas que permiten asociarlas con el estado de diplotene temprana de la profase de la meiosis (fig. 1). Rodeando a cada oocito, en contacto con la membrana celular se disponen las células foliculares de núcleo prominente.

A partir de los 50 μm de diámetro los oocitos se hallan rodeados por las tecas. En los oocitos cuyos diámetros están comprendidos entre los 50 y 150 μm (subtipo *b*), la basofilia del citoplasma se ve incrementada notablemente. El núcleo presenta en la zona periférica una mayor cantidad de nucléolos. A medida que el diámetro celular aumenta, los nucléolos tienden a disminuir el volumen. La membrana nuclear manifiesta leves ondulaciones. Ocupando todo el volumen del núcleo se observan los cromosomas en diplotene temprano (fig. 2). Aumentan las células foliculares alrededor de los oocitos.

Los oocitos que presentan un diámetro comprendido entre los 150 y 270 μm (subtipo *c*), se observan levemente opacos. En los cortes histológicos el citoplasma evidencia zonas densas, continuas o irregulares alrededor de núcleo, con gran afinidad por los colorantes básicos, que denominamos zonas basófilas del citoplasma. El núcleo conserva la posición central. La membrana nuclear presenta ondulaciones que se hacen más notorias a medida que aumenta el tamaño del oocito. En la zona cortical del núcleo es evidente el aumento del número de los nucléolos esferoidales. Los cromosomas que pierden su afinidad por los colorantes básicos pueden observarse en el área central del núcleo. La membrana vitelina comienza a visualizarse como una delgada y discontinua envoltura PAS positiva rodeando a los oocitos, por debajo de las células foliculares.

ESTADIO 2. VITELOGÉNESIS TEMPRANA

Los oocitos que inician el proceso de vitelogénesis y cuyos diámetros están comprendidos entre 270 y 310 μm (subtipo *a*) se caracterizan por un color blanco opaco. El citoplasma exhibe vesículas en la zona periférica, que dan reacción PAS positiva, y contactan con la membrana celular (figs. 3-4). Zonas basófilas se disgregan alrededor del núcleo. La vesícula germinal manifiesta una membrana excesivamente saculada que se proyecta hacia el citoplasma. Los nucléolos se disponen ocupando la mayor parte del núcleo. Son evidentes nucléolos bipartitos, constituidos por dos zonas de distinta afinidad por el colorante. Las zonas menos densas pueden repetirse en la estructura del mismo nucléolo y disponerse alternadamente en forma lineal o como brotes sobre la esfera más densa, generalmente de mayor volumen (fig. 5). La membrana vitelina continúa su desarrollo envolviendo totalmente al oocito.

Los oocitos de color ocre claro con un diámetro que oscila entre los 310 y 350 μm conforman el subtipo *b*. Las observaciones histológicas ponen de manifiesto la presencia de vitelo de apariencia granular en la zona cortical del oocito, que se destaca del resto del citoplasma por su gran afinidad por los colorantes ácidos (fig. 6). Se ha estudiado con MET esta zona del oocito, pudiéndose identificar pequeñas plaquetas vitelinas y vesículas cuyo contenido central es de forma irregular (*premelanosomas*, según DUMONT, 1972), dispersas en el citoplasma. La membrana oocitaria manifiesta un gran desarrollo de microvellosidades que se proyectan hacia la membrana vitelina.

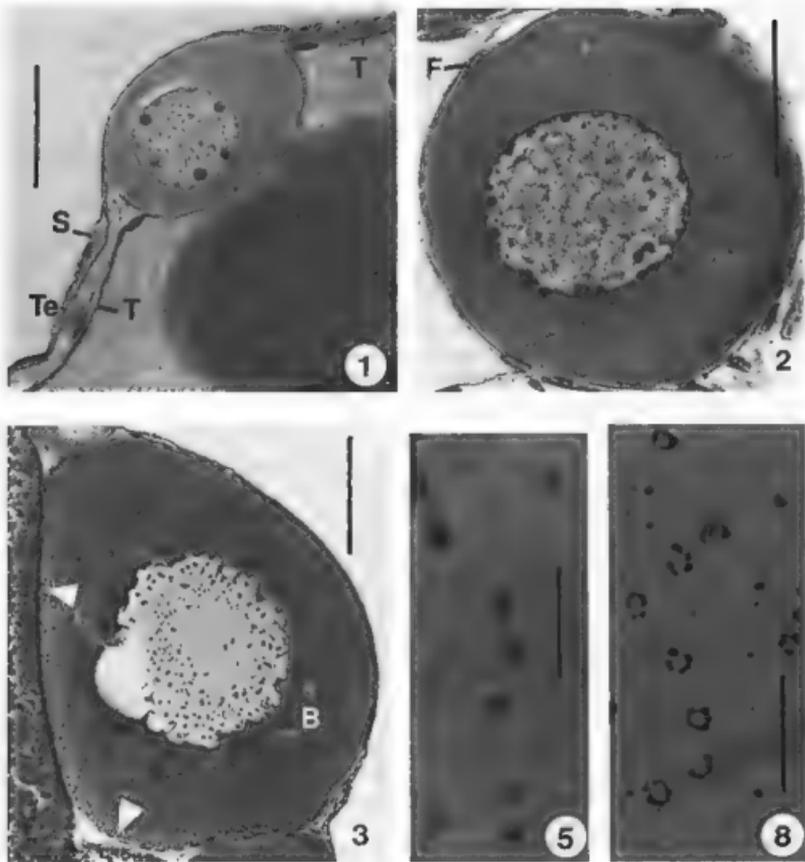


Fig 1. - Oocito de estadio 1a. S, serosa; T, teca interna, Te, teca externa. Tricrómico de Masson. Escala: 20 μ m.

Fig 2. Vista general de oocito de estadio 1b. F, núcleo de célula folicular. Tricrómico de Masson. Escala: 30 μ m.

Fig. 3. Vista general de oocito de estadio 2a. Triángulos blancos, citoplasma periférico. B, zonas basófilas. Tricrómico de Masson. Escala. 100 μ m.

Fig. 5. Nucléolos bipartitos en el núcleo de un oocito de estadio 2a. Verde de metilo-pironina. Escala: 20 μ m.

Fig. 8. - Nucléolos en anillo. Azul de metileno. Escala 20 μ m.

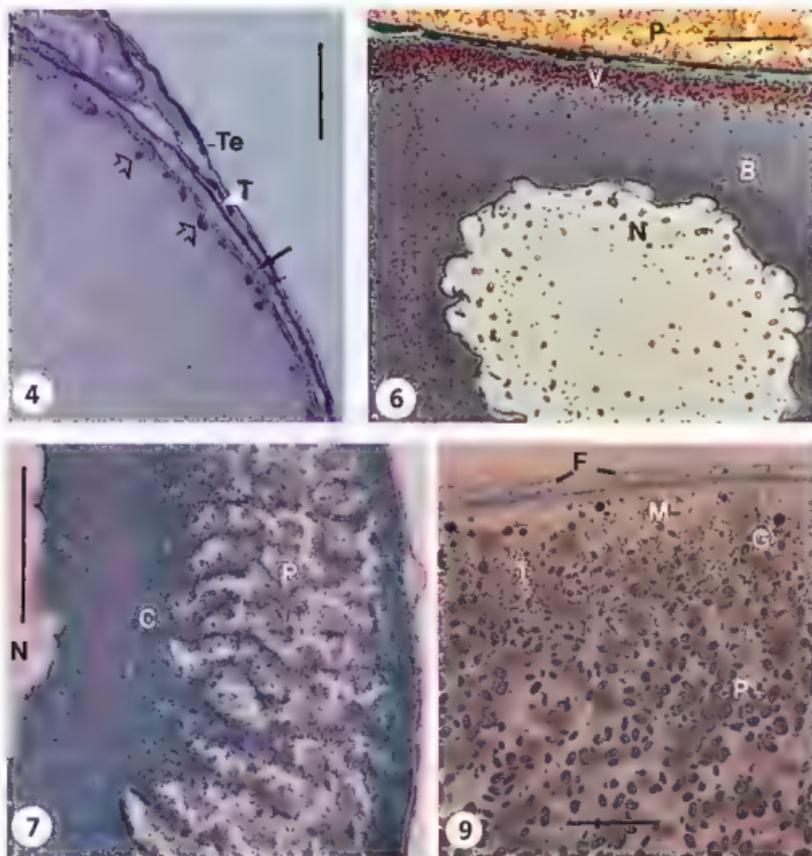


Fig 4. - Citoplasma periférico de oocito de estadio 2a con zonas irregulares PAS positivas (sagittas negras cortas) adyacentes a la membrana vitelina (sagitta negra larga) T, teca interna, Te, teca externa. PAS - azul Alcian. Escala: 20µm

Fig. 6 - Sección de un oocito de estadio 2b con una banda periférica de vitelo (V). B, zonas basófilas, N, núcleo, P, plaquetas vitelinas de un oocito adyacente en vitelogénesis tardía Tricrómico de Masson. Escala: 50 µm.

Fig 7 - Oocito de estadio 3a. Plaquetas vitelinas (P) invadiendo el citoplasma (C) N, núcleo Coloración de Mann. Escala: 50 µm

Fig. 9. - Corte semifino de un oocito de estadio 3a coloreado con azul de metileno F, núcleo de células foliares; G, gránulo cortical, I, pigmento, M, membrana vitelina, P, plaquetas vitelinas. Escala: 20 µm.

ESTADIO 3. VITELOGÉNESIS ACTIVA

A partir de los 350 y hasta 650 μm , el vitelo se encuentra organizado en plaquetas vitelinas, ocupando las dos terceras partes del citoplasma (subtipo *a*). A medida que progresa la vitelogénesis se observa un gradiente en la forma y tamaño de las plaquetas; las más pequeñas se ubican en la zona subcortical de la célula, mientras que las más internas son de mayor tamaño. El citoplasma sin plaquetas queda restringido a una franja perinuclear (fig. 7). Las vesículas PAS positivas, localizadas en la zona más externa de la banda de vitelo, aumentan en número y tamaño. El núcleo conserva las características del estadio anterior y los nucléolos se hallan distribuidos en todo el volumen nuclear; aparecen nucléolos con distinta morfología. Se identifican tres tipos: nucléolos bipartitos; nucléolos en forma de anillo, constituidos por cuentas, que se observan con frecuencia en la zona más central (fig. 8); y nucléolos esferoidales simples periféricos. En la zona cortical del citoplasma se evidencia la presencia de gránulos de pigmento y de gránulos corticales de 2,5 μm , cercanos a la membrana celular (figs. 9-10); éstos son esféricos y su contenido es homogéneo.

Los oocitos cuyo diámetro oscila entre los 650 y 740 μm se caracterizan por presentar un color castaño en toda su superficie (subtipo *b*). El citoplasma se halla invadido por plaquetas vitelinas, las cuales alcanzan el núcleo. La franja perinuclear de citoplasma basófilo queda reducida a un anillo de grosor variable inmerso en el vitelo. Los gránulos de pigmento se distribuyen homogéneamente en toda la región cortical de la célula (fig. 11). La disposición de los nucléolos se modifica. Los nucléolos bipartitos se agrupan en el centro del núcleo y nucléolos esferoidales se localizan en la periferia.

A partir de los 750 μm de diámetro, comienza a distinguirse un desplazamiento gradual del pigmento (subtipo *c*). Las plaquetas vitelinas de mayor tamaño se ubican en el centro del hemisferio vegetativo, por debajo de la vesícula germinal. Los gránulos corticales se hallan distribuidos en una amplia franja de citoplasma cortical entre las plaquetas vitelinas. El núcleo migra hacia la zona más pigmentada del oocito, el hemisferio animal. La morfología del mismo se modifica de esférica a oval, y su eje mayor se dispone paralelo al ecuador del oocito. En la zona periférica del núcleo aparecen nucléolos esféricos de aspecto vacuolar o *vacuolados* (según DUMONT, 1972) que contienen áreas de material de menor afinidad por los colorantes básicos.

ESTADIO 4. VITELOGÉNESIS TARDÍA

Estos oocitos presentan una visible polarización del pigmento. El hemisferio animal, castaño oscuro, contrasta con el hemisferio vegetativo de color castaño claro. El diámetro está comprendido entre los 900 y 1200 μm . La figura 12 muestra una vista general de un corte de un oocito de estadio 4. El citoplasma está totalmente ocupado por plaquetas vitelinas que se distribuyen según un gradiente de tamaño. Alrededor del núcleo son evidentes las de menor tamaño. La membrana nuclear manifiesta una serie de pliegues hacia el interior del núcleo que se hacen más numerosos y profundos hacia el lado del hemisferio vegetativo. Los nucléolos periféricos se observan con mayor frecuencia entre los pliegues de la membrana nuclear. En el centro se agrupan nucléolos esferoidales de menor

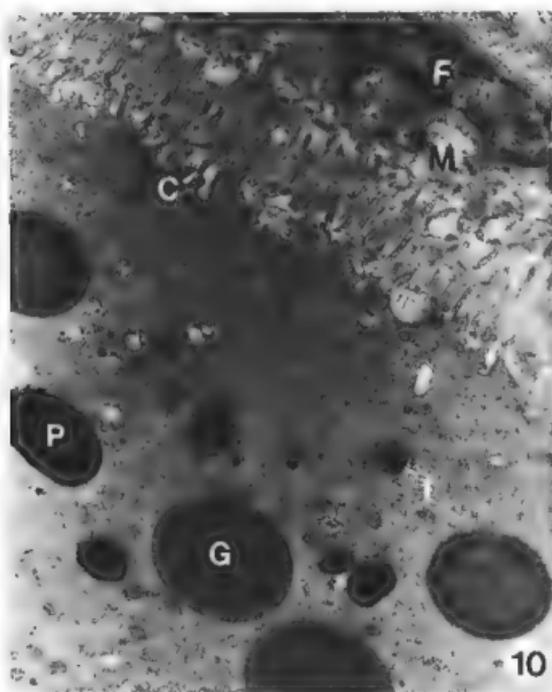


Fig. 10 - Región cortical de un oocito en estadio 3a. C, membrana citoplasmática; F, núcleo de célula folicular; G, gránulo cortical, I, pigmento, M, membrana vitelina; P, plaqueta vitelina. Aumento: 7000 \times .

tamaño y de apariencia homogénea. Los cromosomas comienzan a visualizarse en la zona central al aumentar su afinidad por los colorantes básicos. El núcleo presenta un halo subnuclear de material basófilo y PAS positivo, en íntimo contacto con los pliegues de la membrana. El tratamiento con diastasa produce una reacción PAS negativa. Con MET se observa que está constituido por mitocondrias y un material electro-opaco que podría asociarse con glucógeno y ribosomas (fig. 13). Los gránulos corticales se disponen ordenados debajo de la membrana plasmática. Presentan un diámetro aproximado de 3 μm . En el hemisferio animal, los gránulos de pigmento se hallan por debajo de los gránulos corticales.

ESTADIO 5. OOCITO OVULABLE O MADURO

En estos oocitos, cuyos diámetros oscilan entre 1200 y 1400 μm , se acentúa la diferencia de coloración entre el hemisferio animal y el vegetativo. El hemisferio animal,

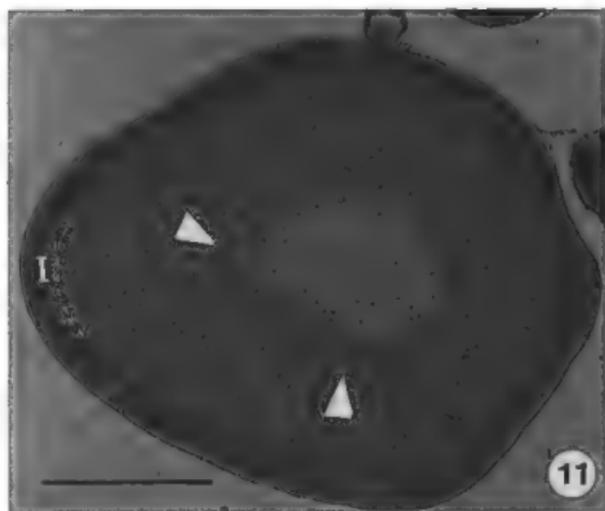


Fig. 11. -- Vista general de oocito de estadio 3b. Pigmento (I) distribuido en la región cortical y banda de material perinuclear basófilo (triángulos blancos). Hematoxilina de Harris - eosina Escala: 200 μ m.

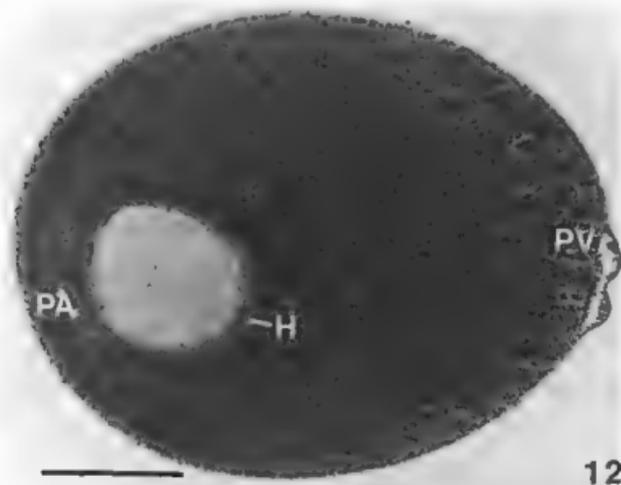


Fig. 12. -- Vista general de un oocito de estadio 4 Polo animal (PA) con pigmento H, halo subnuclear; PV, polo vegetativo Hematoxilina de Harris - eosina. Escala: 300 μ m.

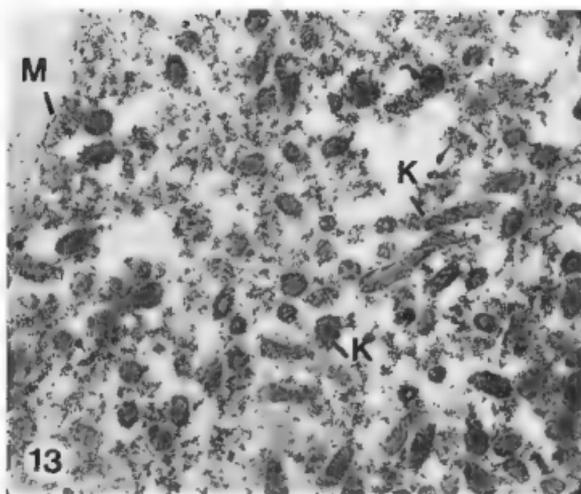


Fig. 13. — Citoplasma subnuclear de oocito de estadio 4. K, mitocondrias; M, membrana nuclear. Aumento: 22500 \times .

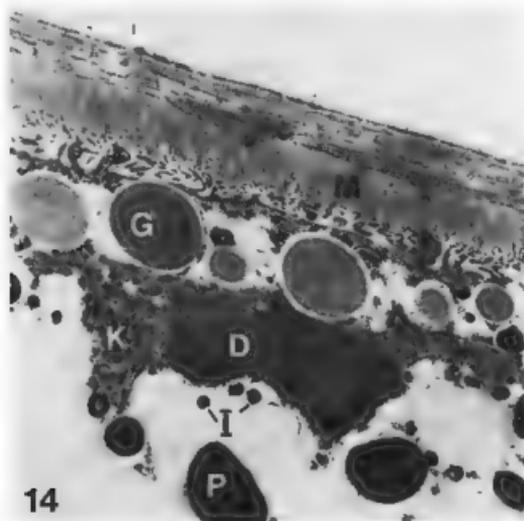


Fig 14. — Región cortical del polo animal de un oocito de estadio 5. D, complejo de Golgi; G, gránulo cortical; I, gránulos de pigmento; K, mitocondrias, M, membrana vitelina, P, plaqueta vitelina. Aumento: 6000 \times .

de color castaño oscuro, presenta una zona circular en el polo animal con menos pigmento. La disposición de las plaquetas vitelinas en el citoplasma es semejante a la del estadio 4. En el hemisferio vegetativo, las plaquetas alcanzan una longitud máxima de 10 μm . El anillo subnuclear persiste en estos oocitos. En el núcleo se observa una reducción del número de nucléolos. Los nucléolos periféricos aumentan de tamaño alcanzando un diámetro de 9 μm . En este estadio los cromosomas son poco visibles con las técnicas de coloración utilizadas. Los gránulos corticales conservan la forma esférica, se hallan situados por debajo de la membrana celular y alcanzan un diámetro de 4 μm . Las microvellosidades oocitarias se hallan retraídas y el espacio perivitelino se ve aumentado (fig. 14).

DISCUSIÓN

Para establecer los estadios de la oogénesis se han utilizado distintos criterios. En *Rana pipiens*, están basados principalmente en el tamaño del oocito o en la cantidad y distribución del vitelo y del pigmento (GRANT, 1953; KEMP, 1953), aunque otros autores utilizaron solamente la morfología de los cromosomas (DURYEE, 1950). En *Xenopus laevis*, la identificación de los estadios se basa en el aspecto externo de los oocitos y en las observaciones histológicas de los mismos (DUMONT, 1972; CALLEN, 1984). En este trabajo se han considerado los caracteres morfológicos externos e internos de los oocitos, integrando las diferentes propuestas aludidas, que permite establecer cinco estadios de la oogénesis con ocho subestadios que se sintetizan en la Tabla I. Los cinco estadios se consideran suficientes y convenientes para establecer el curso de la oogénesis.

El pigmento ha sido considerado como un producto catabólico y comienza a aparecer cuanto más activo es el metabolismo del oocito (VALDEZ TOLEDO & PISANÓ, 1980). En *Bufo arenarum*, la formación del pigmento se evidencia en el estadio de vitelogénesis primaria, distribuido en todo el citoplasma (VALDEZ TOLEDO & PISANÓ, 1980; ECHEVERRÍA, 1988). La acumulación de la melanina en oocitos de *Xenopus laevis* se incrementa durante los estadios de vitelogénesis temprana y tardía hasta el estadio V (DUMONT, 1972). En *Melanophryniscus stelzneri*, el pigmento es escaso y de color castaño a diferencia de las especies anteriormente mencionadas, en las cuales éste es negro y abundante. El pigmento aparece al comienzo del estadio de vitelogénesis activa distribuido homogéneamente en el citoplasma cortical. A partir del estadio 4 se acumula en el hemisferio animal, siendo característica la presencia de la mancha polar en el polo animal en el estadio 5

El inicio del proceso de vitelogénesis se evidencia en *Melanophryniscus stelzneri* en el estadio de vitelogénesis temprana (2.a) con la aparición de pequeñas vesículas en la zona cortical del citoplasma. Las plaquetas vitelinas se organizan al finalizar la vitelogénesis temprana (estadio 2.b), ubicándose en la periferia de la célula. Todas las plaquetas vitelinas son homogéneas independientemente de su ubicación y tamaño, es decir, no se distingue en ellas un cuerpo principal cristalino como se describe en las especies estudiadas (WISCHNITZER, 1957). DUMONT (1972) y OPRESKO et al. (1980) proponen que el aumento de tamaño de las plaquetas vitelinas es ocasionado por la fusión de vesículas endocíticas a las plaquetas ya formadas. En *M. stelzneri*, se ha podido observar con microscopio

electrónico de transmisión grupos de pequeñas plaquetas que se contactan; este hecho podría interpretarse como un proceso de fusión. El crecimiento de las plaquetas posiblemente se produzca a expensas del material presente en el citoplasma.

La mayoría de los autores asocia la aparición de las vesículas de vitelo y de los gránulos corticales con formaciones PAS positivas y menciona que la aparición de éstas se produce en forma simultánea.

En *Rana pipiens*, *Xenopus laevis* y *Bufo arenarum*, los gránulos corticales se observan por primera vez en el cortex del oocito, durante el estadio de vitelogénesis temprana o primaria (WARD & WARD, 1968; DUMONT, 1972; VALDEZ TOLEDO & PISANÓ, 1980) BALINSKY & DAVIS (1963) describieron a los gránulos corticales como cuerpos con matriz granular de aspecto homogéneo, de 2 µm de diámetro que aparecen durante la vitelogénesis primaria. En *M. stelzneri*, se evidencian durante la etapa de vitelogénesis activa, a la vez que se observa un aumento de los complejos de Golgi y de las vesículas de vitelo. Las observaciones con microscopio electrónico de transmisión mostraron similitudes en cuanto al aspecto de la sustancia que compone los gránulos corticales pero, con respecto al tamaño de los mismos, no se hallaron coincidencias respecto de las especies aludidas (KEMP & ISTOK, 1967; ANDREUCCETTI & CAMPANELLA, 1980), siendo los gránulos corticales de *M. stelzneri* los más desarrollados.

Si bien la actividad ovárica de las hembras adultas de *X. laevis* y *B. arenarum* no son equivalentes (CALLEN et al., 1986; ECHEVERRÍA & GONZALEZ, 1994), se debe destacar que *M. stelzneri* comparte, con las especies mencionadas, los patrones generales del ciclo de la vitelogénesis. En los oocitos de *M. stelzneri*, una banda de material basófilo perinuclear se hace evidente al final de la previtelogénesis y en los oocitos en vitelogénesis temprana, y un halo subnuclear de características basófilas se halla en los oocitos maduros. Una banda discontinua de material citoplasmático similar a la hallada en *M. stelzneri* ha sido puesta de manifiesto en *Bufo lentiginosus* (KING, 1908) y en *B. arenarum* (ECHEVERRÍA, 1974, 1987) con técnicas histológicas generales y reacciones histoquímicas para condrioma. TOURTE et al. (1984) confirman por primera vez en *X. laevis* la presencia de mitocondrias en el citoplasma agrupadas en una corona perinuclear. Cabe señalar que *X. laevis* y *M. stelzneri* presentan mitocondrias agrupadas por fuera de la membrana nuclear que se denominan corona ("crown", TOURTE et al., 1984) y halo subnuclear respectivamente. El halo subnuclear contiene, además, gránulos de glucógeno que podrían motivar la respuesta positiva a la reacción de PAS, mientras que las zonas basófilas del citoplasma de *M. stelzneri*, análogas a la corona perinuclear de *X. laevis*, no reaccionan con PAS.

Tanto el número como la morfología de los nucléolos de los oocitos de *M. stelzneri* presentan variaciones en el transcurso del desarrollo. En oocitos muy jóvenes y en los maduros, los nucléolos presentan una forma esferoidal, pero en estadios intermedios, éstos pueden adoptar distintas morfologías: bipartitos, anulares y vacuolados. Se han descrito nucléolos en forma de collar y de anillo en diferentes especies de anfibios como *Plethodon cinereus* (MACGREGOR, 1965), *Ambystoma mexicanum* (CALLAN, 1966) y *Notophthalmus viridescens* (LANE, 1967), siendo poco frecuente la descripción de estos nucleólos en los anuros. En *Bufo arenarum*, ECHEVERRÍA (1980) los describe con una morfología semejante a los que hemos hallado en *M. stelzneri*. LANE (1967) y VAN GANSEN & SCHRAM (1972) propusieron que la variación morfológica aludida es producida por cambios en la

distribución en el ADN y por la segregación de los constituyentes granulares y fibrilares del nucléolo respectivamente. Los nucléolos bipartitos hallados en *M. stelzneri* son equivalentes a los nucléolos vacuolares descritos en *B. arenarum* por ECHEVERRÍA (1980). Se utilizó el término bipartito debido a que presentan por lo menos dos partes con distinta afinidad por los colorantes básicos, a fin de distinguirlos de los nucléolos vacuolados hallados en *X. laevis* por DUMONT (1972) y en *M. stelzneri*, que contienen áreas de material con menor afinidad por los colorantes básicos.

RESUMEN

En hembras maduras de *Melanophryniscus stelzneri* (N = 17) de las Sierras de Córdoba (Tanti) y de San Luis (El Trapiche), se identifican cinco estadios de la oogénesis con ocho subestadios (subtipos) estructurados sobre la base de la aparición de vesículas de vitelo, plaquetas vitelinas, gránulos corticales y de pigmento, variaciones morfológicas de la membrana nuclear y de los nucléolos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gladys N. PELLERANO de la Cátedra de Histología Animal, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por la lectura crítica del manuscrito, a la Lic. Luisa E. FIORITO por su contribución con material de Tanti, Córdoba, al Dr. Mario RIVERO por el apoyo técnico en el uso del microscopio electrónico, y al Sr. GONZÁLEZ del Servicio de Microscopía del Depto. de Ciencias Biológicas (FCEN, UBA)

LITERATURA CITADA

- ALLENDE, J. L. C. DE, 1938. Ciclo sexual del *Bufo arenarum* hembra. *Rev. Soc. arg. Biol. Córdoba*, **14**: 515-522
- AMALDI, F., LAVA-SANCHEZ, P. A. & BOUNGIORNI-NARDELLI, M., 1973. — Nucleolar DNA content variability in *Xenopus laevis*: a redundancy regulation common to all gene families. *Nature*, **242**: 615-617.
- ANDEUCCETTI, P. & CAMPANELLA, C., 1980. — Origin and cytochemistry of the animal dimple granules in *Discoglossus pictus* (Anura) eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, **56**: 239-252.
- BALINSKY, B. I. & DEVIS, R. J., 1963. — Origin and differentiation of cytoplasmic structures in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Acta Embryol. Morph. exp.*, **6**: 55-108.
- BOUIN, M., 1901. — Histogenèse de la glande génitale femelle chez *Rana temporaria*. *Arch. Biol.*, **17**: 201-381
- BROWN, D. D. & DAWID, I. B., 1968. — Specific gene amplification in oocytes. *Science*, **160**: 272-280.
- CALLAN, H. G., 1966. — Chromosomes and nucleoli of the axolote, *Ambystoma mexicanum*. *J. Cell Sci.*, **1**: 85-108.
- CALLEN, J.-C., 1984. — *Biogenèse des mitochondries au cours de la différenciation de l'ovocyte de Xenopus laevis* Thèse, Univ. Paris XI.
- CALLEN, J.-C., DENNEBOUY, N. & MOUNOLOU, J.-C., 1986. — Early onset of a large pool of previtellogenic oocytes and cyclic escape by vitellogenesis: the pattern of ovarian activity of *Xenopus laevis* females and its physiological consequences *Reprod. Nutr. Dével.*, **26** (1 A): 13-30

- CEI, J. M., 1980. — Amphibians of Argentina. *Monit. zool. ital.*, Monogr. 2: 1-609.
- DRURY, R. A. B. & WALLINGTON, E. A., 1967. — *Carleton's histological techniques*. Edinburgh, Neil & Co. Ltd.: 1-432.
- DUMONT, J. N., 1972. — Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.*, 136 (2): 153-180.
- DURYEE, W. R., 1950. — Chromosomal physiology in relation to nuclear structure. *Annals New York Acad. Sci.*, 50 (8): 920-953.
- ECHEVERRÍA, D. D., 1974. — *Morfología de la oogénesis en Bufo arenarum*. Biblioteca FCE y N, Univ. Buenos Aires: 1-48.
- 1980. — Morfología de los nucléolos de los oocitos de *Bufo arenarum* (Anura). *Physis*, (C), 39 (96): 1-7.
- 1987. — *Organogénesis en Bufo arenarum. Desarrollo de la gónada*. Tesis, Biblioteca FCE y N, Univ. Buenos Aires: 1-248.
- 1988. — Oogénesis en las hembras juveniles de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). *Rev. Mus. arg. Cs. nat. Bernardino Rivadavia, Zool.*, 15 (5): 57-75.
- ECHEVERRÍA, D. D. & GONZALEZ, B. N., 1994. — Variación estacional en la proporción relativa de los estadios de la oogénesis en *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae). *Cuad. Herp.*, 8 (1): 30-38.
- GALLARDO, J. M., 1987. — *Anfibios argentinos. Guía para su identificación*. Buenos Aires, Biblioteca Mosaico: 1-98.
- GRANT, P., 1953. — Phosphate metabolism during oogenesis in *Rana temporaria*. *J. exp. Zool.*, 124: 513-543.
- IWASAWA, H., 1969. — Gonadal development in young frogs of *Rana ornativentris*, with special reference to sex differentiation and sex ratio. *Annot. zool. jap.*, 42: 183-192.
- IWASAWA, H., NAKAZAWA, T. & KOBAYASHI, T., 1987. — Histological observations on the reproductive organs of growing *Rana nigromaculata* frogs. *Sci. Rep. Niigata Univ.*, (D) (Biology), 24: 1-13.
- KARASAKI, S., 1963. — Studies on amphibian yolk. 5. Electron microscopic observations on the utilization of yolk platelets during embryogenesis. *J. ultrastruct. Res.*, 9: 225-247.
- KEMP, N. E., 1953. — Synthesis of yolk in oocytes of *Rana pipiens* after induced ovulation. *J. Morph.*, 92: 487-511.
- KEMP, N. E. & ISTOCK, N., 1967. — Cortical changes in growing oocytes and fertilized or pricked eggs of *Rana pipiens*. *J. Cell Biol.*, 34: 111-122.
- KING, H. D., 1908. — The oogenesis of *Bufo lentiginosus*. *J. Morph.*, 19: 369-437.
- LAMOTTE, M., GLAÇON, R. & XAVIER, F., 1973. — Recherches sur le développement embryonnaire de *Nectophrynoides occidentalis* Angel, amphibien anoure vivipare. II. Le développement des gonades. *Ann. Embr. Morphog.*, 6 (3): 271-296.
- LANE, N. J., 1967. — Spheroidal and ring nucleoli in amphibian oocytes. Patterns of uridine incorporation and fine structural features. *J. Cell Biol.*, 35: 421-434.
- LANZAVECCHIA, G., 1968. — Problems of the yolk formation in amphibia. *Atti Simp. Accad. naz. Lincei*, 104: 101-109.
- MACGREGOR, H. C., 1965. — The role of lampbrush chromosomes in the formation of nucleoli in amphibian oocytes. *Avat. J. microsc. Sc.*, 106 (3): 215.
- MASSOVER, W. H., 1971. — Intramitochondrial yolk. Crystals of frog oocytes. *J. Cell Biol.*, 48: 266-279.
- MERCER, E. H. & BIRBECK, M. S. C., 1979. — *Manual de microscopía electrónica para biólogos*. Segunda edición. Rosario, España, H. Blume: 1-134.
- OPRESKO, L., WILLEY, H. S. & WALLACE, R. A., 1980. — Differential postendocytotic compartmentation in *Xenopus* oocytes is mediated by a specifically bound ligand. *Cell*, 22: 47-57.
- PEARSE, A. G. E., 1972. — *Histochemistry: theoretical and applied*. Third edition. London, Churchill Livingstone: 1-1054.
- REYNOLDS, E. S., 1963. — The use of the lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- SCHERER, V. & DABAUVALLE, M. C., 1985. — Functional organization of the amphibian oocyte nucleus. In: L. W. BROWDER (ed.), *Developmental biology*, I, Calgary Univ., Alberta, Canada: 385-430.
- TOURTE, M., MIGNOTTE, F. & MOUNOLOU, J.-C., 1984. — Heterogeneous distribution and replication activity of mitochondria in *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Cell Biol.*, 34: 171-178.

- VALDEZ TOLEDO, C. L. & PISANÓ, A., 1980. — Fases ovogenéticas en *Bufo arenarum*. *Reproducción*, **4**: 315-330.
- VAN GANSEN, P. & SCHRAM, A., 1972. — Evolution of the nucleoli during oogenesis in *Xenopus laevis* studied by electron microscopy. *J. Cell Sci.*, **10**: 339-367.
- VILLECO, E., SÁNCHEZ RIERA, A. & SÁNCHEZ, S., 1992. — Plaquetas vitelinas y sus membranas durante la vitelogénesis de *Ceratophrys cranwelli*. *Resúmen IX Jornadas Científicas*, Sociedad de Biología de Tucumán: resúmen N°19.
- WALLACE, R. A., 1985. — Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: L. W. BROWDER (ed.), *Developmental biology*, **1**, Calgary Univ., Alberta, Canada: 127-177.
- WALLACE, R. A. & DUMONT, J. N., 1968. — The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocytes in *Xenopus laevis*. *J. Cell Physiol.*, **72** (suppl. 1): 73-89.
- WALLACE, R. A. & KARASAKI, S., 1963. — Studies on amphibian yolk: the isolation of yolk platelets from the eggs of *Rana pipiens*. *J. Cell Biol.*, **18**: 153-166.
- WALLACE, R. A., NIKOL, J. M., HO, T. & JARED, D. W., 1972. — Studies of amphibian yolk. X. The relative roles of autotrophic and heterotrophic processes during yolk protein assembly by isolated oocytes. *Dev. Biol.*, **29**: 255-272.
- WARD, R. T., 1962. — The origin of protein and fatty yolk in *Rana pipiens*. II. Electron microscopical and cytochemical observations of young and mature oocytes. *J. Cell Biol.*, **14**: 309-341.
- WARD, R. T., OPRESKO, L. & WALLACE, R. A., 1985. — A comparison of the proteins of yolk platelets and intramitochondrial crystals in the oocyte of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Dev. Biol.*, **112**: 56-65.
- WARD, R. T. & WARD, E., 1968. — The origin and growth of cortical granules in the oocytes of *Rana pipiens*. *J. Microsc.*, **7**: 1021-1030.
- WISCHNITZER, S., 1957. — The ultrastructure of yolk platelets of amphibian oocytes. *J. Biochem. Biophys. Cytol.*, **3**: 1040-1041.

Corresponding editor: Alain DUBOIS.